

Über den Nachweis des Histidins.

Von

K. Inouye.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Dezember 1912.)

Die Bildung eines Azofarbstoffs kann, wie H. Pauly im Jahre 1904 gezeigt hat,¹⁾ zum Nachweis von Histidin benutzt werden. Läßt man Diazobenzolsulfosäure bei Gegenwart von überschüssigem Natriumcarbonat auf eine wässrige Lösung von Histidin einwirken, so entsteht eine dunkelkirschrote Färbung, welche selbst beim Verdünnen mit einer vielfachen Menge Wasser ihren roten Ton behält und nicht gelbstichig wird. Die Empfindlichkeitsgrenze liegt unterhalb einer Verdünnung von 1 : 100000. Die Reaktion tritt auch mit dem im Eiweißmolekül gebundenen Histidin ein, nur wird der Wert dieser Reaktion dadurch bedeutend beeinträchtigt, daß das Tyrosin sowohl im freien Zustand wie in intraproteiner Bindung ebenfalls unter Farbstoffbildung mit der Diazobenzolsulfosäure reagiert. Die Reaktion ist also bei den meisten Proteinstoffen oder in dem Gemisch ihrer Spaltungsprodukte nicht ohne weiteres zum Nachweis des Histidins verwendbar.

Auf Veranlassung des Herrn Prof. A. Kossel habe ich versucht, die Reaktion so zu modifizieren, daß sie das Tyrosin nicht mehr anzeigt, während die Reaktion des Histidins unverändert bleibt. Eine solche Unterscheidung läßt sich durch die vorhergehende Einwirkung des Benzoylchlorids bewirken. Schüttelt man eine Lösung von Tyrosin nach Zusatz von überschüssiger Sodalösung mit einigen Tropfen Benzoylchlorid in einem Reagenzglase, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist, so entsteht auf Zusatz von Diazobenzolsulfo-

¹⁾ H. Pauly, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 508, 1904.

säure die charakteristische Rotfärbung nicht. Führt man denselben Versuch mit einer verdünnten wässrigen Histidinlösung aus, so tritt die bekannte Rotfärbung ein. Selbst eine reichliche Menge von Benzoylchlorid bringt die Fähigkeit des Histidins, unter Farbstoffbildung mit Diazobenzolsulfosäure zu kuppeln, nicht zum Verschwinden. Es ist jedoch erforderlich, die Zersetzung des Benzoylchlorids abzuwarten, viel unzersetztes Benzoylchlorid hindert die Reaktion.

Mit diesen Ergebnissen stimmte auch die Untersuchung der reinen Benzoylverbindungen des Histidins und des Tyrosins überein. Benzoylhistidin, nach Pauly¹⁾ dargestellt, gab die Rotfärbung mit Diazobenzosulfosäure, während das nach E. Fischer²⁾ und A. Schultze³⁾ dargestellte Dibenzoyltyrosin sich gegen die Diazobenzosulfosäure negativ verhielt. Nach den Angaben von A. Schultze ist dies leicht verständlich, denn einer der Benzoylreste tritt an die Stelle der Hydroxylgruppe des Benzolkerns, und die Millonsche Reaktion fehlt. Ebenso wie das Benzoylhistidin verhielt sich das Dinaphthalinsulfohistidin.

Hiernach erwartete ich, daß die Reaktion zum Nachweis der Histidingruppe auch im unzersetzten Proteinmolekül zu verwenden sei. Dies war jedoch nicht der Fall. Als ich histidin-haltige Proteine, z. B. Sturin mit Benzoylchlorid bei Gegenwart von überschüssigem Natriumcarbonat schüttelte, ging das Vermögen zur Farbstoffbildung mit Diazobenzosulfosäure verloren.

Die Reaktion gestattet also eine bequeme Unterscheidung des im Protein gebundenen Histidins von dem nicht gebundenen Histidin. Wahrscheinlich ist es die Peptidbindung der Carboxylgruppe des Histidins, welche den Eintritt der Benzoylgruppe in den Imidazolkern in einer solchen Weise ermöglicht, daß nunmehr die Reaktion mit Diazobenzosulfosäure nicht mehr erfolgen kann. Es scheint dies aus dem Verhalten des von

¹⁾ Pauly, Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 43, S. 2254, 1910.

²⁾ E. Fischer, Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 32, S. 2454 (1899).

³⁾ A. Schultze, Diese Zeitschrift, Bd. 29, S. 479 (1900).

Pauly beschriebenen¹⁾ Histidinmethylesters hervorzugehen. Derselbe verhält sich wie das im Eiweiß gebundene Histidin. Er gibt an sich die Kuppelung mit Diazobenzolsulfosäure, nach vorhergehender Einwirkung von Natriumcarbonat und Benzoylchlorid bleibt jedoch die Rotfärbung auf Zusatz von Diazobenzolsulfosäure aus.

Zur Prüfung der Proteine auf das Vorkommen des Histidins ist eine vorhergehende Hydrolyse erforderlich, die man entweder mit Hilfe von Säuren oder durch Trypsin bewirken kann. Man wird die schneller ausführbare Säurespaltung im allgemeinen vorziehen; wendet man die Trypsinprobe an, so ist natürlich ein Kontrollversuch erforderlich, durch welchen man nachweist, daß aus dem Trypsinpräparat selbst nicht Histidin in störender Menge hervorgeht. Ich führe einige Beispiele derartiger Versuche an.

Für den ersten und vierten Versuch diente ein Protein-stoff, welcher sowohl Histidin wie Tyrosin enthielt, für den zweiten das Sturin, welches nur Histidin und kein Tyrosin liefert, für den dritten das Orzysin, ein aus den Testikeln des Thunfisches gewonnenes Protamin, welches nach den bisher noch nicht publizierten Untersuchungen von A. Kossel kein Histidin, wohl aber Tyrosin enthält. Die Präparate wurden mir von Herrn Professor A. Kossel für diese Versuche zur Verfügung gestellt.

I. 0,5 g Witte-Pepton wurden mit 2,5 ccm konz. Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, sodann auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit Bleioxyd erwärmt und nach dem Abkühlen mit Natriumcarbonat bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Die Flüssigkeit wurde nun filtriert und das farblose Filtrat in bekannter Weise mit Diazobenzolsulfosäure geprüft. Die Reaktion fiel, wie zu erwarten war, positiv aus. Nun wurde ein Teil der Flüssigkeit mit einem großen Überschuß von Benzoylchlorid geschüttelt und die Prüfung mit Diazobenzolsulfosäure wiederholt. Auch jetzt trat Rotfärbung ein, als Beweis für die Gegenwart des Histidins in diesem Proteinmolekül.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 514.

II. 0,5 g Sturinsulfat wurden in gleicher Weise verarbeitet. Das von Salzsäure befreite Reaktionsprodukt gab auch nach dem Schütteln mit Benzoylchlorid die Farbenreaktion mit Diazobenzolsulfosäure.

III. 0,5 g Orzyninsulfat in gleicher Weise verarbeitet. Das von Salzsäure befreite Reaktionsprodukt gab die Farbenreaktion mit Diazobenzolsulfosäure. Dieselbe tritt jedoch nicht ein, nachdem die Flüssigkeit mit Benzoylchlorid geschüttelt ist.

IV. 0,15 g käufliches Trypsin wurden in 30 ccm 0,5% iger Natriumcarbonatlösung gelöst.

a) 20 ccm dieser Lösung wurden mit 2 g Witte-Pepton unter Zusatz von etwas Chloroform in den Brutofen gebracht.

b) 10 ccm dieser Lösung wurden ohne Zusatz von Witte-Pepton im Brutofen digeriert.

Nach zweitägiger Digestion wurden beide Lösungen mit Salzsäure neutralisiert, auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Benzoylchlorid geschüttelt.

Die Trypsinlösung gab nur zweifelhafte, rötlich-gelbe Färbung mit Diazobenzolsulfosäure, während die mit Pepton versetzte Probe eine sehr starke, rein rote Färbung zeigte. Somit konnte das aus dem Eiweiß abgespaltene Histidin auf diese Weise leicht nachgewiesen werden, und es bietet sich hiernach die Möglichkeit, auf diesem Wege die fermentative Abspaltung des Histidins aus Eiweiß in ähnlicher Weise zu verfolgen, wie dies beim Tyrosin und Tryptophan ausgeführt ist.



